

血清 microRNA 在肿瘤诊断和预后评估中的应用

许建^①, 武治印^②, 于典科^{①*}

① 中国医学科学院肿瘤医院病因及癌变研究室, 北京 100021;

② 中国生物技术发展中心, 北京 100036

* 联系人, E-mail: yudianking@gmail.com

2009-07-15 收稿, 2009-08-22 接受

摘要 介绍了血清 microRNA 与肿瘤发生的关系, 并且在此基础上系统介绍了国内外将血清 microRNA 作为肿瘤标志物的研究进展. 尽管血清 microRNA 作为肿瘤的分子标志物尚有许多问题要解决, 但目前的研究结果已经证明血清 microRNA 表达谱的变化与多种肿瘤的发生、发展具有明确的相互关系, 说明血清 microRNA 可以作为肿瘤临床诊断和预后评估的分子标志物. 而且, 血清 microRNA 自身的特性也决定了其在应用于肿瘤临床诊断和预后评估时具有创伤小、技术快速、便捷等优点.

关键词

肿瘤标志物
血清 microRNA
诊断
预后

恶性肿瘤是危害人类健康和生命安全的重要疾病, 寻找肿瘤标志物一直都是肿瘤研究的重要领域. 肿瘤标志物在癌症的早期诊断、个体化治疗、预后判断等诸多方面都具有重要作用. 较常见的肿瘤标志物有蛋白酶类、肿瘤特异性抗原、肿瘤代谢产物、激素、癌基因和抑癌基因以及甲基化 DNA 等, 但目前肿瘤标志物的检测大多程序繁杂且具有损伤性, 从而限制了其临床应用. microRNA 是一类调控基因表达的非编码小 RNA, 长度为 21~24 nt, 参与多种生物学信号通路的调节^[1], 组织或血清中 microRNA 的异常表达与多种人类恶性肿瘤密切相关^[2]. 目前, 血清中 microRNA 表达谱的检测技术已经成熟, 方法快速、便捷, 精确度和灵敏度可满足临床需求. 血清 microRNA 有望成为新兴的肿瘤诊断和预后的分子标志物.

1 microRNA 与肿瘤的发生相关

microRNA 是一类高度保守的非编码小 RNA, 主要通过结合靶基因 mRNA 的 5' UTR^[3,4]、编码区^[5]或 3' UTR 而在转录后水平上对基因的表达行负调控功能. microRNA 参与基因表达调控的方式主要是抑制

翻译过程的进行, 少数情况下也可引起 mRNA 降解^[6]. 生物信息学分析表明, 每个 microRNA 可能调节数百个靶基因, 提示 microRNA 可能参与调节细胞生命活动中众多的信号转导途径, 在细胞增殖、分化、凋亡、免疫反应及血管生成等一系列过程中发挥作用^[7]. miR-16-1, miR-143, miR-145 等可因 p53, p68 与 Drosha 复合物相互作用而表达上调, 从而抑制细胞增殖^[8]. microRNA 表达异常会严重影响细胞信号转导途径的功效, 导致细胞增殖和分化失去控制, 最终导致肿瘤的发生.

2 不同肿瘤组织具有特异 microRNA 表达谱的变化特征

目前研究 microRNA 表达谱的常用技术主要有 Northern 杂交、表达芯片、实时荧光定量 PCR 和 Solexa 测序等^[9]. 通过分析不同肿瘤组织与正常组织 microRNA 表达谱的差异, 有可能筛选到特异性好、灵敏度高、可作为特定肿瘤分子标志物的 microRNA. 不同肿瘤组织中 microRNA 的表达谱差异较大, 除了 microRNA 表达的数量和丰度有所差异外, 在某些肿

英文引用格式: Xu J, Wu Z Y, Yu D K. Serum microRNA and its applied prospect in tumor diagnosis and prognosis (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 2~6, doi: 10.1360/972009-1565

瘤中上调表达的 microRNA, 在另一些肿瘤中可能表达下调, 提示 microRNA 在不同条件下可行使癌基因或抑癌基因的功能^[2]。此外, 有些 microRNA 表达具有组织特异性, 如 miR-122 仅在肝脏中表达^[10,11]。

与正常组织相比, miR-21, miR-155 和 miR-17-92 家族等 microRNA 在多种肿瘤中表达上调。miR-21 在成胶质细胞瘤、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、胃癌等多种恶性肿瘤中上调表达^[12,13]。PTEN 是 miR-21 的主要靶基因, 其产物是一种具有蛋白与脂质磷酸酯酶活性的双特异性磷酸酯酶, 对磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸有特异性的 3'位脱磷酸活性, 该功能可使 PTEN 抑制 PI3K/Akt 信号转导途径的功能, 从而导致 PTEN 的异常表达与肿瘤细胞的生长、迁移和侵袭相关^[14]。例如, miR-155 在 B 细胞淋巴瘤^[15]和乳腺癌^[16]组织中上调表达, 并且与肺癌的低生存率相关^[17]; miR-17-92 家族在肺癌^[18]、恶性淋巴瘤^[19,20]组织中表达上调, 并且 miR-17-92 家族的表达受 MYC 等蛋白的调控, 与肿瘤发生有密切关系^[21]。

在肿瘤组织下调表达的 microRNA 靶基因大部分增强了细胞的生长、发育或增殖活性。当 microRNA 表达下调时, 这些基因过量表达导致细胞生长失去控制, 发生癌变。例如, miR-15a 和 miR-16 参与调控 BCL2, CYCLIN D1 和 WNT3A 的表达^[22], 而在垂体腺瘤^[23]和慢性 B 型淋巴细胞性白血病^[22]患者中这两个 microRNA 经常表达下调。let7 家族参与调控 RAS, HMGA2 和 MYC 的表达^[24], 而 let7 家族的下调表达与肺癌发生及术后生存期短相关^[25]。此外, MYC 蛋白的过表达也可以直接抑制 let7 家族的活性^[21]。miR-122 的调控功能涉及肝脏细胞生长、代谢、蛋白表达和病毒感染等多种过程, miR-122 下调表达和肝癌发病密切相关^[11]。miR-34 家族调节 p53 的表达, 在多种肿瘤中起重要的调控作用^[26], 而且 miR-34b/miR-34c 在胃癌^[27,28]和神经母细胞瘤^[29]等肿瘤中均表达下调。此外, miR-145 的表达下调与乳腺癌^[30,31]和结肠癌^[32]发病风险相关。

3 血清与肿瘤组织中 microRNA 的表达谱相关

虽然肿瘤组织 microRNA 表达谱与肿瘤发病及预后相关, 但是检测技术复杂、创伤大, 难以真正应用于临床诊断。相比较而言, 外周血血清较易获得和检测, 临床应用便捷, 利于推广。血清中是否存在血清 microRNA 的表达谱与对应肿瘤组织 microRNA 表

达谱关联? 2008 年至今已报道多项血清 microRNA 与肿瘤关系的研究工作, 为血清 microRNA 作为分子标记应用于肿瘤的早期诊断和预后提供了工作基础。microRNA 在血清中可长期稳定存在, 耐 RNA 酶降解, 煮沸、反复冻融、酸碱环境、长期保存等各种处理方法均不会造成血清 microRNA 的损失^[33]。血清 microRNA 的来源尚无定论, 现在普遍认为其来源于组织细胞的主动分泌过程^[34]。成熟的 microRNA 在细胞内被脂质或脂蛋白包被成外切酶体(Exosome), 分泌至胞外并进入血液; 进入血液的外切酶体可经内吞作用进入受体细胞并去包被, 释放出 microRNA 发挥生物学功能^[35]。外切酶体介导的细胞间 microRNA 的交流, 是细胞通讯的一种新的途径, 对维持内环境的稳态有重要作用^[36]。

今年 2 月, 血浆 miR-92 被成功用作结直肠癌的分子标志物, 灵敏度可达 89%, 特异性达到 70%, 且肿瘤切除后 miR-92 的表达量较术前显著降低; 令人鼓舞的是, 血清 miR-92 作为分子标志物可以诊断 I~IV 期的结直肠癌, 而早期诊断可以大大提高生存率和改善预后^[37]。在舌鳞状上皮细胞癌的研究中发现, miR-184 在癌组织中的表达提高了 59 倍以上, 患者术后的血浆 miR-184 表达量降低到只有原来的 1/10^[38], 这表明血清中 microRNA 表达谱的变化与肿瘤组织关系密切, 血清 microRNA 表达谱有可能替代组织 microRNA 表达谱作为肿瘤标志物。

miR-25 和 miR-223 在非小细胞肺癌患者血清中表达显著上调^[33]。弥漫性大 B 细胞淋巴瘤患者的血清 microRNA 表达谱变异显著, 与正常人相比, 肿瘤患者血清中 miR-155, miR-210 和 miR-21 的表达量分别提高了 5.24, 4.15 和 2.56 倍^[39]; 更重要的是, miR-21 的过表达同无复发间期正相关, 与此前 miR-21 与预后良好正相关的报道吻合^[40]。miR-155 在孕酮受体阳性的乳腺癌患者血清的表达水平高于孕酮受体阴性的患者^[41], 提示 miR-155 可以作为区分激素敏感性和非敏感性的乳腺癌患者的分子标志物, 进一步证明血清 microRNA 具有成为肿瘤诊断和预后标志物的潜力。此外, 前列腺癌病人血清中 miR-141 比正常人血清中的含量高 46 倍, 而血清和血浆 microRNA 表达谱没有差别。据此, 该研究认为, 正常人血清中含量很低或无法检测到, 而在肿瘤病人血清中含量较高的 microRNA 可以确认为肿瘤分子标志物^[34]。上述研究结果提示, 血清 microRNA

与肿瘤组织中 microRNA 的表达谱相关,进一步的研究将加速血清 microRNA 作为肿瘤标志物应用于临床检测的进程。

4 血清 microRNA 作为肿瘤标志物的优势和应用前景

血清 microRNA 作为肿瘤诊断和预后的标志物,主要有以下优点:检测的损伤小、稳定性好、灵敏度高,可应用于早期肿瘤的检测。但是,由于血清中 microRNA 的表达量较低,寻找一种灵敏度高、操作简便且成本低廉的检测方法是目前血清 microRNA 应用于肿瘤临床检测亟待解决的问题。

实时荧光定量 PCR 是目前检测血清 microRNA 的主要方法,该方法需要选择合适的内参,以消除样品间 RNA 含量的差异,所选内参的稳定性决定了检测结果的可靠与否。目前已有多种可供选择的内参,如 miR-16^[39],miR-142-3p^[42],miR-24^[40],RNU6B^[37],人工合成的外源 microRNA^[34]及总 RNA^[33]等。在实际应用中也可同时检测几种 microRNA,然后用 geNORM, NormFinder, Bestkeeper 和 REST 等软件进行分析,选择一种或多种变异度较小的 microRNA 作为内参^[43,44]。此外,电化学传感器检测技术的研究也取得了重要进展,电化学传感器检测探针与靶 microRNA 结合形成 RNA/DNA 双链后会引发电流的变化,并且

变化的幅度与 microRNA 的量线性相关。利用这一特性可将检测到的电流变化值换算为血清中 microRNA 的含量。该方法检测灵敏度可达到 0.1 pmol,足以满足检测血清 microRNA 的要求,但该技术的广泛应用有待进一步的验证和完善^[45]。

在选择肿瘤标志物时,应优先选择在肿瘤中表达上调的血清 microRNA,这样也可提高检测的灵敏性和特异性^[34]。另一方面,仅仅采用一种血清 microRNA 作为肿瘤标志物往往特异性不足,若将多种 microRNA 组合使用并与其他类型肿瘤标志物检测相结合,可望显著提高诊断的准确性。个体间血清 microRNA 变异较大,探寻肿瘤发生发展的不同时期个体血清 microRNA 表达谱的变化规律并阐明作用机理,是将 microRNA 检测应用于恶性肿瘤个体化诊断的一个关键问题。只有传感器技术等检测手段逐渐成熟且血清 microRNA 调控机制不断揭示,这一问题才有望得以解决。

现在临床使用的肿瘤标志物促进了诊断的发展,但是目前的诊断技术大都具有较大的创伤性,其临床应用受到限制。而血清 microRNA 作为肿瘤诊断和预后分子标志物不仅具有创伤小,方法准确、便捷的优势,而且还可改进疾病诊断、癌症分类、预后估计、疗效及复发预测的精度。血清 microRNA 作为新兴的肿瘤分子标志物在未来的肿瘤临床诊断和治疗中将会有更好的应用前景。

参考文献

- 1 O'Hara S P, Mott J L, Splinter P L, et al. MicroRNAs: Key modulators of posttranscriptional gene expression. *Gastroenterology*, 2009, 136: 17—25
- 2 Zhang B, Pan X, Cobb G P, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 2007, 302: 1—12
- 3 Lytle J R, Yario T A, Steitz J A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 9667—9672
- 4 Orom U A, Nielsen F C, Lund A H. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 2008, 30: 460—471
- 5 Tay Y, Zhang J, Thomson A M, et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 2008, 455: 1124—1128
- 6 Ruvkun G. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 2001, 294: 797—799
- 7 Bethke A, Fielenbach N, Wang Z, et al. Nuclear hormone receptor regulation of microRNAs controls developmental progression. *Science*, 2009, 324: 95—98
- 8 Hiroshi I S, Kaoru Y, Koichi S, et al. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 2009, 460: 529—533
- 9 Hafner M, Landgraf P, Ludwig J, et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*, 2008, 44: 3—12
- 10 Jopling C L, Norman K L, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006, 71: 369—376
- 11 Girard M, Jacquemin E, Munnich A, et al. MiR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*, 2008, 48: 648—656
- 12 Cho W C. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*, 2007, 6: 60

- 13 Gramantieri L, Fornari F, Callegari E, et al. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med*, 2008, 12: 2189—2204
- 14 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 2007, 133: 647—658
- 15 Eis P S, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3627—3632
- 16 Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65: 7065—7070
- 17 Yu S L, Chen H Y, Chang G C, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*, 2008, 13: 48—57
- 18 Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 2005, 65: 9628—9632
- 19 Ota A, Tagawa H, Karnan S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*, 2004, 64: 3087—3095
- 20 Tagawa H, Seto M. A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma. *Leukemia*, 2005, 19: 2013—2016
- 21 Dews M, Homayouni A, Yu D, et al. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*, 2006, 38: 1060—1065
- 22 Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: Short RNAs go a long way. *Cell*, 2009, 136: 586—591
- 23 Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, et al. MiR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*, 2005, 204: 280—285
- 24 Park S M, Shell S, Radjabi A R, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle*, 2007, 6: 2585—2590
- 25 Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 2004, 64: 3753—3756
- 26 He L, He X, Lowe S W, et al. MicroRNAs join the p53 network-another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 819—822
- 27 Katada T, Ishiguro H, Kuwabara Y, et al. MicroRNA expression profile in undifferentiated gastric cancer. *Int J Oncol*, 2009, 34: 537—542
- 28 Ji Q, Hao X, Meng Y, et al. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer*, 2008, 8: 266
- 29 Cole K A, Attiyeh E F, Mosse Y P, et al. A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol Cancer Res*, 2007, 67: 11099—11101
- 30 Wang S, Bian C, Yang Z, et al. MiR-145 inhibits breast cancer cell growth through RTKN. *Int J Oncol*, 2009, 34: 1461—1466
- 31 Sempere L F, Christensen M, Silahatoglu A, et al. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res*, 2007, 67: 11612—11620
- 32 Wang C J, Zhou Z G, Wang L, et al. Clinicopathological significance of microRNA-31, -143 and -145 expression in colorectal cancer. *Dis Markers*, 2009, 26: 27—34
- 33 Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 2008, 18: 997—1006
- 34 Mitchell P S, Parkin R K, Kroh E M, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 10513—10518
- 35 El-Hefnawy T, Raja S, Kelly L, et al. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics. *Clin Chem*, 2004, 50: 564—573
- 36 Valadi H, Ekström K, Bossios A, et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 654—659
- 37 Ng E K, Chong W W, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of colorectal cancer patients: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 2009, 58: 1375—1381
- 38 Wong T S, Liu X B, Wong B Y, et al. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*, 2008, 14: 2588—2592
- 39 Lawrie C H, Gal S, Dunlop H M, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 2008, 141: 672—675
- 40 Lawrie C H, Soneji S, Marafioti T, et al. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*, 2007, 121: 1156—1161
- 41 Zhu W, Qin W, Atasoy U, et al. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes*, 2009, 2: 89
- 42 Resnick K E, Alder H, Hagan J P, et al. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*, 2009, 112: 55—59
- 43 Ahn K, Huh J W, Park S J, et al. Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. *BMC Mol Biol*, 2008, 9: 78

- 44 Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e36
- 45 Lusi E A, Passamano M, Guarascio P, et al. Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs. *Anal Chem*, 2009, 81: 2819—2822
-

Serum microRNA and its applied prospect in tumor diagnosis and prognosis

XU Jian¹, WU ZhiYin² & YU DianKe¹

¹ *Department of Etiology & Carcinogenesis, Cancer Institute and Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;*

² *China National Center for Biotechnology Development, Beijing 100036, China*

The aim of this paper is to introduce the relationship of the serum microRNAs and carcinogenesis and the progress of the serum microRNAs as the potential clinical biomarkers of various cancers. Though much difficulty remains in the serum microRNAs studies, more evidences indeed proved the associations between the serum microRNA profiles and the carcinogenesis. Moreover, the serum microRNAs detection is low-invasive and easy to handle, indicating the serum microRNAs might to be useful biomarkers for tumor diagnosis or prognosis.

tumor biomarker, serum microRNA, diagnosis, prognosis

doi: 10.1360/972009-1565